

SEQ ID NO: 311



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/62, 9/90, A01N 61/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/37028
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Oktober 1997 (09.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/01539		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. März 1997 (26.03.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 12 772.6 29. März 1996 (29.03.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Gräfensteinstrasse 14, D-67434 Neustadt (DE). LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). WILLIAM, Martin [US/DE]; Eichthalstrasse 26a, D-38114 Braunschweig (DE). SCHNARRENBARGER, Claus [DE/DE]; Kantstrasse 5, D-12169 Berlin (DE). KELLER-MANN, Josef [DE/DE]; Gumstrasse 6a, D-82152 Planegg (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Title: RIBOSE-5-PHOSPHATE ISOMERASE (D-RIBOSE-5-PHOSPHATE KETOL ISOMERASE, EC 5.3.1.6)			
(54) Bezeichnung: RIBOSE-5-PHOSPHAT ISOMERASE (D-RIBOSE-5-PHOSPHAT KETOL ISOMERASE, EC 5.3.1.6)			
(57) Abstract A protein with ribose-5-phosphate isomerase activity, containing an amino acid sequence representing a partial sequence of at least 100 amino acids from SEQ ID N°2, and nucleic acids coding said protein and its use for identifying herbicidal active agents.			
(57) Zusammenfassung Protein mit Ribose-5-Phosphat Isomerase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt, sowie für dieses Protein kodierende Nukleinsäuren und seine Verwendung zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monsco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Ribose-5-Phosphat Isomerase (D-Ribose-5-Phosphat Ketol Isomerase, EC 5.3.1.6)

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine mit Ribose-5-Phosphat Isomerase Aktivität, ihre Verwendung in Testsystemen, sowie Nukleinsäuren, die für diese Proteine codieren.

10

Pflanzen sind in der Lage, unter Verwendung von Lichtenergie aus atmosphärischem Kohlendioxid organische Verbindungen unter Sauerstoffbildung aufzubauen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet.

15

Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Verteilung der Photosyntheseprodukte das Wachstum einer Pflanze stark beeinflussen.

20 Da Pflanzen auf eine funktionierende Photosynthese angewiesen sind und vergleichbare Reaktionen in tierischen Organismen nicht vorkommen, bietet sich der Photosyntheseapparat als ideales Ziel für den Einsatz von Herbiziden an.

25 Die komplexen Reaktionen, die zur Kohlendioxidfixierung führen unterteilt man in Licht- und Dunkelreaktion. Die Lichtreaktion dient der Bereitstellung von Energie in Form von ATP und von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. In der Dunkelreaktion (reduktiver Pentosephosphatzyklus oder Calvin Zyklus) werden
30 diese Verbindungen zur Synthese organischer Kohlenstoffverbindungen genutzt.

Einige der bekannten Herbizide (z.B. Dichlorphenylmethyl-harnstoff oder Paraquat) wirken durch eine Inhibierung der Lichtreaktion. Die Dunkelreaktion wird nach bisherigen Erkenntnissen
35 als Angriffspunkt für Herbizide nicht genutzt.

Die Enzymreaktionen des reduktiven Pentosephosphatzyklus werden in drei Abschnitte unterteilt:

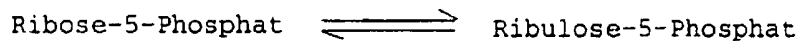
40

- a) Carboxylierung
- b) Reduktion
- c) Regenerierung.

45 Bei der Carboxylierung reagiert Kohlendioxid mit dem Akzeptormolekül Ribulose-Bisphosphat (RuBP), wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PGA) gebildet werden. Anschließend wird

3-PGA nach Phosphorylierung zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) reduziert. In der Regenerationsphase wird das Akzeptormolekül RuBP aus dem entstandenen GAP resynthetisiert. Von sechs gebildeten Molekülen GAP kann ein Molekül für andere Stoffwechselwege
5 eingesetzt werden.

Eine Vielzahl der am reduktiven Pentosephosphatzyklus beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für Herbizide dar. Eine besondere Stellung nimmt dabei die plastidäre Ribose-5-Phosphat
10 Isomerase ein, die folgende Reaktion katalysiert:



15 Das Enzym hat eine amphibolische Funktion, d.h. es ist sowohl Teil des reduktiven Pentosephosphatzyklus (Calvin-Zyklus) als auch des oxidativen Pentosephosphatweges und hat somit eine wichtige Funktion in photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Geweben.

20

Ribose-5-Phosphat wird über die Phosphoribosylpyrophosphat Synthetase in Phosphoribosyl-pyrophosphat übergeführt, das als Ribose-5-Phosphat-Donormolekül in der Tryptophan- und Nukleotidbiosynthese fungiert. Zudem leiten sich vom Ribose-5-Phosphat
25 und Ribulose-5-Phosphat über die plastidäre Transketolase und die Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase das Erythrose-4-Phosphat, Sedoheptulose-7-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat ab. Erythrose-4-Phosphat ist ein Mittler zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Verknüpft mit Phosphoenol-
30 pyruvat mündet Erythrose-4-Phosphat in den Shikimat-Weg, der zur Synthese aromatischer Aminosäuren und phenolischer Substanzen führt. Exportierte Triosephosphate dienen im Zytoplasma als Substrate für Glykolyse und Gluconeogenese. Fruktose-6-Phosphat wird als Vorläufermolekül zur Herstellung von Stärke in den
35 Plastiden genutzt. Ribulose-5-Phosphat wird ATP-abhängig durch die Phosphoribulokinase in Ribulose-1,5-Bisphosphat überführt, welches als primärer Kohlendioxidakzeptor fungiert.

Wegen Ihrer zentralen Bedeutung an der Synthese dieser Vorläufer-
40 moleküle von essentiellen Stoffwechselwegen kommt der Ribose-5-Phosphat Isomerase eine besondere Bedeutung zu.

Ursprünglich wurde in verschiedenen Pflanzenspezies eine Isoform der Ribose-5-Phosphat Isomerase nachgewiesen (Heber et al., 1967,
45 Z. Naturf. 22b, 1200-1215). Später wurden in pflanzlichen Geweben zwei Ribose-5-Phosphat Isomerase-Isoformen beschrieben, die sich

in ihrer subzellulären Kompartimentierung unterscheiden {Anderson, 1971, Biochim Biophys Acta 235, 507-512}.

Solche Berichte führten zur verbreiteten Meinung, daß zytosolische Isoenzyme des oxidativen und reduktiven Pentosephosphatweges allgemein in Pflanzen vorkommen. Neuere Untersuchungen weisen jedoch daraufhin, daß der oxidative/reduktive Pentosephosphatweges nur in den Chloroplasten vollständig abläuft, da die Enzyme mit Ausnahmen (z.B. Triosephosphat Isomerase und Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) nur im plastidären Kompartiment nachweisbar sind {Schnarrenberger et al., 1995, Plant Physiol. 108, 609-614}.

Die plastidäre Ribose-5-Phosphat Isomerase liegt als Homodimer mit einer relativen Molekularmasse von ca. 53 kDa vor {Rutner, 1970, Biochem., 178-184}. Für die Ribose-5-Phosphat Isomerase-Aktivitätsmessung sind keine Cofaktoren bekannt, jedoch sind Ethylendiamintetraacetat (EDTA) als Chelator und Mercaptoethanol als Oxidationsschutz in vitro für die Aktivitätsmessung notwendig. Nukleotide haben keine inhibierende Wirkung auf die Ribose-5-Phosphat Isomerase-Aktivität {Rutner, 1970, Biochem., 178-184}.

Gene, die für Ribose-5-Phosphat Isomerase kodieren, wurden bisher aus E. coli {Hove-Jensen und Maigaard, 1993, J. Bacteriol. 175, 5628-5635; Sorensen und Hove-Jensen, 1996, J. Bacteriol. 178, 1003-1011} und Maus {Apel et al., 1995, Gene 156 191-197} isoliert und beschrieben. Durch Datenvergleiche lassen sich Ribose-5-Phosphat Isomerase-ähnliche Sequenzen identifizieren, deren Funktion unbekannt ist (Caenorhabditis elegans, Haemophilus influenzae, Synechocystis PCC6803; siehe Genbank U10428, U32729, D64002). Gene pflanzlicher Ribose-5-Phosphat Isomerasen sind bisher nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine pflanzliche Ribose-5-Phosphat Isomerase in reiner Form durch Klonierung des entsprechenden Gens zur Verfügung zu stellen.

Demgemäß wurde ein Protein mit Ribose-5-Phosphat Isomerase Aktivität, enthaltend die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz, gefunden.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Das in SEQ ID NO 2 dargestellte Protein ist ein sogenanntes Vorläuferprotein bestehend aus 289 Aminosäuren. Das reife Protein entsteht aus der Vorläuferform durch Abspalten des chloroplasti-

dären Transitpeptides, das gemäß einer N-terminalen Sequenzierung des reifen Proteins aus 50 Aminosäuren besteht.

Sowohl das Vorläuferprotein, als auch durch Substitution,
5 Deletion oder Insertion von Aminosäuren davon abgeleitete Proteine, die noch über eine Ribose-5-Phosphat Isomerase-Aktivität verfügen, gehören zu den erfindungsgemäßen Proteinen.

Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Amino-
10 säuren durch eine oder mehrere andere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die neue Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Val durch Ile, Ser durch Thr.

15 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung; bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

20 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch eine oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

25 Besonders bevorzugt sind Proteine, die durch N-terminale Verkürzungen um 20 bis 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 entstehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die oben genannten Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäure-
30 sequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des
35 betreffenden Organismus' leicht ermitteln.

Soll die pflanzliche Ribose-5-Phosphat Isomerase beispielsweise in einem Bakterium exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die "codon usage" des Bakteriums bei der Rückübersetzung
40 zu verwenden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die die für die erfindungsgemäße Ribose-5-Phosphat Isomerase kodierenden Nukleinsäuren zusammen mit funk-
45 tionellen Regulationssignalen enthalten. Regulationssignale sind u.a. der konstitutiv Genexpression vermittelnde Promotoren wie der 35S CaMV Promotor {Franck et al., 1980, Cell 21, 285-294}

sowie Terminationssignale wie das Polyadenylierungssignal des Ti-Plasmids pTiACH5 {Gielen et al., 1984. EMBO J. 3, 835-846} und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus Tabak Mosaic Virus {Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15, 5 8693-8711}.

Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich besonders zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen, insbesondere zur Auffindung von Ribose-5-Phosphat Isomerase spezifischen Hemmstoffen.

10

Dazu können die Proteine beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Ribose-5-Phosphat Isomerase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen 15 läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide

20 Eigenschaften überprüft werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit einem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

25 Die Erfindung besteht außerdem in einem Verfahren zur Herstellung von herbiziden Mitteln, die eine pflanzliche Ribose-5-Phosphat Isomerase inhibieren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem oben beschriebenen Testverfahren überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit 30 üblichen Träger- und Hilfsstoffen formuliert.

Daß die Ribose-5-Phosphat Isomerase inhibierende Eigenschaft einer Substanz allein nicht ausreicht für die Eignung als Herbizid, sondern noch weitere Prüfungen durchzuführen sind,

35 ist jedem Fachmann geläufig.

Das Verfahren gestattet es jedoch reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen. 40

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

45

Beispiele

A. Biochemische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

5

1. Enzymassay

Wie beschrieben (Schnarrenberger et al., 1995, Plant
Physiol. 108, 609-614) wurde die Aktivität der Ribose-
10 5-Phosphat Isomerase bestimmt in 40 mM Kaliumphosphat pH
7,4, 5 mM Magnesiumchlorid, 0,5 U Ribose-5-Phosphat Iso-
merase, 1 U Transketolase, 1 U Triosephosphat Isomerase
und 1 U Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase, 240 mM NADH,
15 10 mM Ribose-5-Phosphat.

15

2. Proteinreinigung

Ribose-5-Phosphat Isomerase wurde als kommerziell erhält-
liche Präparation bezogen (Sigma). Die Aufreinigung
20 erfolgte über Ionenaustausch-chromatographie mit DEAE¹⁾-
Fractogel (Merck) äquibriert in 10 mM Kaliumphosphat,
pH 7,5, 10 mM Ethylendiaminotetraacetat (EDTA) und 10 mM
2-Mercaptoethanol. Nach Dialyse gegen Säulenpuffer wurde
das Protein auf die Säule gegeben und über einen Gradien-
25 ten von 0-0,3 M Kaliumchlorid in Säulenpuffer eluiert.
Fraktionen mit Ribose-5-Phosphat Isomerase Aktivität
wurden mithilfe von Polyethylenglykol 20000 konzentriert
und dann gegen Säulenpuffer dialysiert.

30

3. Native Molekulargewichtsbestimmung

Das native Molekulargewicht wurde über HPLC Gelfiltration
bei einer Flußrate von 1,0 ml/min über Bio-Sil TSK 250
(Merck) bestimmt. Letzteres Material wurde in 50 mM
35 Natriumsulfat, 20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 6,8,
äquibriert. Als Proteinstandards wurden beta-Galaktosi-
dase (465 kD), Immunglobulin G (150 kD), Antigen-bind-
des Antikörper-Fragment (Fab, 50 kD) und Myoglobin
(17 kD) verwendet. Das native Molekulargewicht wurde
40 durch Interpolation des Graphen aus Retentionszeit gegen
den Logarithmus des Molekulargewichts bestimmt.

45

¹⁾ Diethylaminoethyl

4. Proteinsequenzierung

Gereinigtes Protein wurde mithilfe von Cyanbromid oder mit Endoproteinase LysC wie beschrieben gespalten
5 {Eckerskorn und Lottspeich, 1989, Chromatographia 28, 92-94}. Die resultierenden Peptide wurden über eine 2 x 125 mm Supersher 60 RP select B Säule (Merck) getrennt. Es wurde bei einer Flußrate von 200 µl/min in einem 1%/min Gradienten von Trifluoressigsäure (0,1 % (v/v))
10 in Wasser und Trifluoressigsäure (0,1 % (v/v)) in Acetonitril gearbeitet. Die resultierenden Peptide wurden in einem automatischen Porton 3600 Sequenziergerät (Beckman) über aminoterminaler Degradation {Edman und Begg, 1967, Eur. J. Biochem., 80-91} abgebaut und die Aminosäuren
15 über das Microbore HPLC System Gold (Beckman) identifiziert.

B. Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

20

1. Allgemeine Klonierungsverfahren

25

30

Klonierungsverfahren wie Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Ligationsansätze, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) {Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6} beschrieben durchgeführt.

2. PCR-Amplifikation eines Fragmentes der Ribose-5-Phosphat Isomerase mithilfe degenerierter Oligonukleotide

35

40

45

Die PCR-Amplifikation der Ribose-5-Phosphat Isomerase wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Reaktionsgemische enthielten 8 ng/1 doppelsträngige Blatt-spezifische Spinat cDNA, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 50 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM Magnesiumchlorid und 0,02 U/1 Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur: 45°C, 1 min
Denaturierungstemperatur: 92°C, 1 min
Elongationstemperatur: 72°C, 1 min
Anzahl der Zyklen: 35

5

Es resultierte ein Fragment von 119 Basenpaaren²⁾, das in den mit dem Restriktionsenzym HincII geschnittenen Vektor pBluescriptSK+ (Stratagene) ligiert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurde E. coli nm522 transformiert und das Plasmid pPCRRpiI erhalten.

10

3. Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mittels einer DNA-Sonde

15

Die Konstruktion der genutzten cDNA-Bank aus Spinat ist beschrieben bei Henze et al., 1994, Plant Mol. Biol. 26, 1961-1973. Es wurden 4×10^4 rekombinante Lambda Phagen der blattspezifischen cDNA-Bibliothek aus Spinat auf Agarplatten mit E. coli POP13 als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren {Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6} auf Nitrocellulosefilter (Gelman Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonde (ClaI/XhoI-Fragment des Plasmides pPCRRpiI) diente die o.g. Sequenz aus 119 Basenpaaren, die mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von α -³²P-dCTP (Amersham; spezifische Aktivität 3000Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60°C in 3 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02 % Ficoll 400³⁾ (w/v) und 50 µg/ml Kalbsthymus DNA für 12-16 Stunden {Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6}. Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v) bei 60°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt und vereinzelt.

20

25

30

35

40

4. Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem automatischen Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer (A.L.F.) der Firma Pharmacia unter Verwendung Fluores-

45

2) dies sind die Basen 511-629 der SEQ ID NO 1.

3) von Serva

zenz-markierter Oligonukleotide nach der Methode von Sanger {Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467}. Es wurden drei Sequenzen codierend für Ribose-5-Phosphat Isomerase erhalten.

5

Die DNA Sequenz der längsten cDNA Sequenz des Klons pRI12 ist in SEQ ID NO1 dargestellt (Genbank Accession Nummer L43068). Der 1118 Basenpaar lange cDNA-Klon pRI12 enthält einen offenen Leseraster von 870 Basen und kodiert für ein Protein mit 239 Aminosäuren. Die Analyse des Polypeptides unter Verwendung der Peptidsequenzen der Mikrosequenzierung ergab, daß am N-Terminus des Proteins eine Sequenz mit typischen Charakteristika eines chloroplastidären Transitpeptids von 50 Aminosäuren vorhanden ist.

15

5. Vergleich der plastidären Ribose-5-Phosphat Isomerase aus Tabak mit bekannten Ribose-5-Phosphat Isomerase Proteinsequenzen über Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons pRI12 (mithilfe der GCG Software (Univerität von Wisconsin, U.S.A.)) mit publizierten Ribose-5-Phosphat Isomerase-Sequenzen ergaben, daß bis zu 36% Aminosäureidentität zu den Sequenzen aus *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus influenzae* und *Synechocystis* PCC6803 bestehen. Aufgrund des Fehlens hochkonservierter Bereiche ist eine Isolation einer pflanzlichen Sequenz mithilfe degenerierter Oligonukleotide abgeleitet aus einem Sequenvergleich dargestellter Sequenzen unwahrscheinlich.

30

35

40

45

Abbildungen

1. Stellung der Ribose-5-Phosphat Isomerase im oxidativen (OPPP)
und reduktiven Pentosephosphatweg (Calvin Zyklus)
5
2. Nukleotidsequenz der plastidären Ribose-5-Phosphat Isomerase
aus Spinat am Beispiel des Klons pRI12
3. Aminosäuresequenz der plastidären Ribose-5-Phosphat Isomerase
aus Spinat abgeleitet vom Beispiel des Klons pRI12
10
4. Aminosäurevergleich der plastidären Ribose-5-Phosphat Isome-
rase aus Spinat mit der Ribose-5-Phosphat Isomerase aus Maus,
E. coli, Caenorhabditis elegans, Synechocystis PC C 6803 und
Haemophilus influenzae
15
5. Peptidsequenzen und Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation der
plastidären Ribose-5-Phosphat Isomerase
20

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: BASF Aktiengesellschaft

(B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38

(C) ORT: Ludwigshafen

(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: D-67056

(G) TELEPHON: 0621/6048526

(H) TELEFAX: 0621/6043123

(I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Ribose-5-Phosphat Isomerase
aus Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0; Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1118 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Spinat
 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 25-894
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```

CCGCTCTCAAACCTCAAACCTCTCCAATGGCTTCCGCCGCTTTCTCTCTCTCTCCCTCCACC 60
      M A S A A F S L L P S T
TCCTCCACCACCTTTAACC GCCCATGCCACCACCAAACCTCCTCAACCTCAAATTCCTCCAC 120
S S T T F N R H A T T K L L N L K F L H
AACCACCGTAACAAACCCCTTCTTCACCACCACAATCAAATCTCTCTCTCTCTCCCTCCCCA 180
N H R N K P F F T T T I K S L S S P S P
ACACCAGTCTTAACTCAAGACGATCTCAAGAACTCGCCGCCGAAAAAGCCGTCGACTCC 240
T P V L T Q D D L K K L A A E K A V D S
GTCAAATCCGGCATGGTTCTCGGTCTCGGAACCGGAAGTACTGCCGCATTGTGCTGTCTCG 300
V K S G M V L G L G T G S T A A F A V S
CGAATCGGCGAGCTTCTCTCTGCGGAAACCTGACCAACATCGTTGGAATTCCTACCTCG 360
R I G E L L S A G K L T N I V G I P T S
AAGCGGACCGCAGAGCAGGCGGCGTCTCTTGGAAATTCGCTCTCCGTTCTCGATGATCAT 420
K R T A E Q A A S L G I P L S V L D D H
CCTCGAATTGACCTCGCCATTGATGGCGCCGATGAGGTTGATCCTGATCTTAATCTGGTT 480
P R I D L A I D G A D E V D P D L N L V
AAGGGGCGCGGTGGGGCGCTCTTGAGAGAAAAGATGGTTGAAGCTGCTAGTGATAAATTT 540
K G R G G A L L R E K M V E A A S D K F
ATTGTTGTTGTTGATGATACTAAGCTTGTTGATGGTTTGGGTGGTAGTCGTCTTGCTATG 600
I V V V D D T K L V D G L G G S R L A M
CCTGTTGAAGTTGTTCAATTTTGCTGGAAATATAATCTCAAGAGATTACAGGAGATCTTT 660
P V E V V Q F C W K Y N L K R L Q E I F
AAGGAGCTGGGTTGTGAGGCAAATTGAGAATGGAAGGGGATAGCAGTCCTTATGTGACT 720
K E L G C E A K L R M E G D S S P Y V T
GACAACTCGAATTACATCGTGGATTTATACTTCCCGACCTCGATTAAGGATGCTGAAGCT 780
D N S N Y I V D L Y F P T S I K D A E A
GCAGGGAGAGAAATTTCCGCCCTTGGAAGGCGTAGTAGAACATGGGTTGTTCTTGGGTATG 840
A G R E I S A L E G V V E H G L F L G M
GCTAGCGAAGTCATCATTGCTGGGAAAACCTGGAGTTAGTGTGAAAACCAAGTGATTTTTG 900
A S E V I I A G K T G V S V K T K Stop
ttggtttgattggttgacttcgggtatggaatagtctccctctccccagaatacctact 960
tgttttcattttatataatgttctctctcacttcattggaatgttttagatgagtttctgggg
tctggtttgatatttttgcattctgttgatctgtttttgtgttttgatttttagctaattgt
gtatgaagtgtagatgaggaatcaatggcgagagcgg 1118

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 289 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

MET ALA SER ALA ALA PHE SER LEU LEU PRO SER THR SER SER THR 15
THR PHE ASN ARG HIS ALA THR THR LYS LEU LEU ASN LEU LYS PHE 30
LEU HIS ASN HIS ARG ASN LYS PRO PHE PHE THR THR THR ILE LYS 45
SER LEU SER SER PRO SER PRO THR PRO VAL LEU THR GLN ASP ASP 60
LEU LYS LYS LEU ALA ALA GLU LYS ALA VAL ASP SER VAL LYS SER 75
GLY MET VAL LEU GLY LEU GLY THR GLY SER THR ALA ALA PHE ALA 90
VAL SER ARG ILE GLY GLU LEU LEU SER ALA GLY LYS LEU THR ASN 105
ILE VAL GLY ILE PRO THR SER LYS ARG THR ALA GLU GLN ALA ALA 120
SER LEU GLY ILE PRO LEU SER VAL LEU ASP ASP HIS PRO ARG ILE 135
ASP LEU ALA ILE ASP GLY ALA ASP GLU VAL ASP PRO ASP LEU ASN 150
LEU VAL LYS GLY ARG GLY GLY ALA LEU LEU ARG GLU LYS MET VAL 165
GLU ALA ALA SER ASP PHE LYS ILE VAL VAL VAL ASP ASP THR LYS 180
LEU VAL ASP GLY LEU GLY GLY SER ARG LEU ALA MET PRO VAL GLU 195
VAL VAL GLN PHE CYS LYS TRP TYR ASN LEU LYS ARG LEU GLN GLU 210
ILE PHE LYS GLU LEU GLY CYS GLU ALA LYS LEU ARG MET GLU GLY 225
ASP SER SER PRO TYR VAL THR ASP ASN SER ASN TYR ILE VAL ASP 240
LEU TYR PHE PRO THR SER ILE LYS ASP ALA GLU ALA ALA GLY ARG 255
GLU ILE SER ALA LEU GLU GLY VAL VAL GLU HIS GLY LEU PHE LEU 270
GLY MET ALA SER GLU VAL ILE ILE ALA GLY LYS THR GLY VAL SER 285
VAL LYS THR LYS STOP

Patentansprüche

1. Protein mit Ribose-5-Phosphat Isomerase-Aktivität, enthaltend
5 eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens
100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als
Aminosäuresequenz die Teilsequenz 50-239 aus SEQ ID NO 2 ent-
10 hält.
3. Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als
Aminosäuresequenz die in SEQ ID NO 2 dargestellte Sequenz
enthält.
15
4. Nukleinsäure, codierend für ein Protein gemäß einem der
Ansprüche 1 bis 3.
5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie
20 aus der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz besteht.
6. Vektoren, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 4 oder
5 zusammen mit funktionellen Regulationssignalen.
- 25 7. Verwendung eines Proteins mit Ribose-5-Phosphat Isomerase-
Aktivität gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 zur Identifizierung
von herbiziden Wirkstoffen.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die
30 Identifizierung mittels eines in vitro Testsystems erfolgt.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als
Testsystem ein Enzymhemmtest eingesetzt wird.
- 35 10. Testsystem zur Identifizierung von Ribose-5-Phosphat
Isomerase-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man
die potentiellen Inhibitoren mit einem Protein gemäß den
Ansprüchen 1 bis 3 inkubiert und anschließend die Ribose-
5-Phosphat Isomerase-Aktivität bestimmt.
40
11. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Test-
systems gemäß Anspruch 10.

45

12. Verfahren zur Herstellung von herbiziden Mitteln, die eine pflanzliche Ribose-5-Phosphat Isomerase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem Testverfahren gemäß Anspruch 10 überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen flüssigen und/oder festen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

10

15

20

25

30

35

40

45

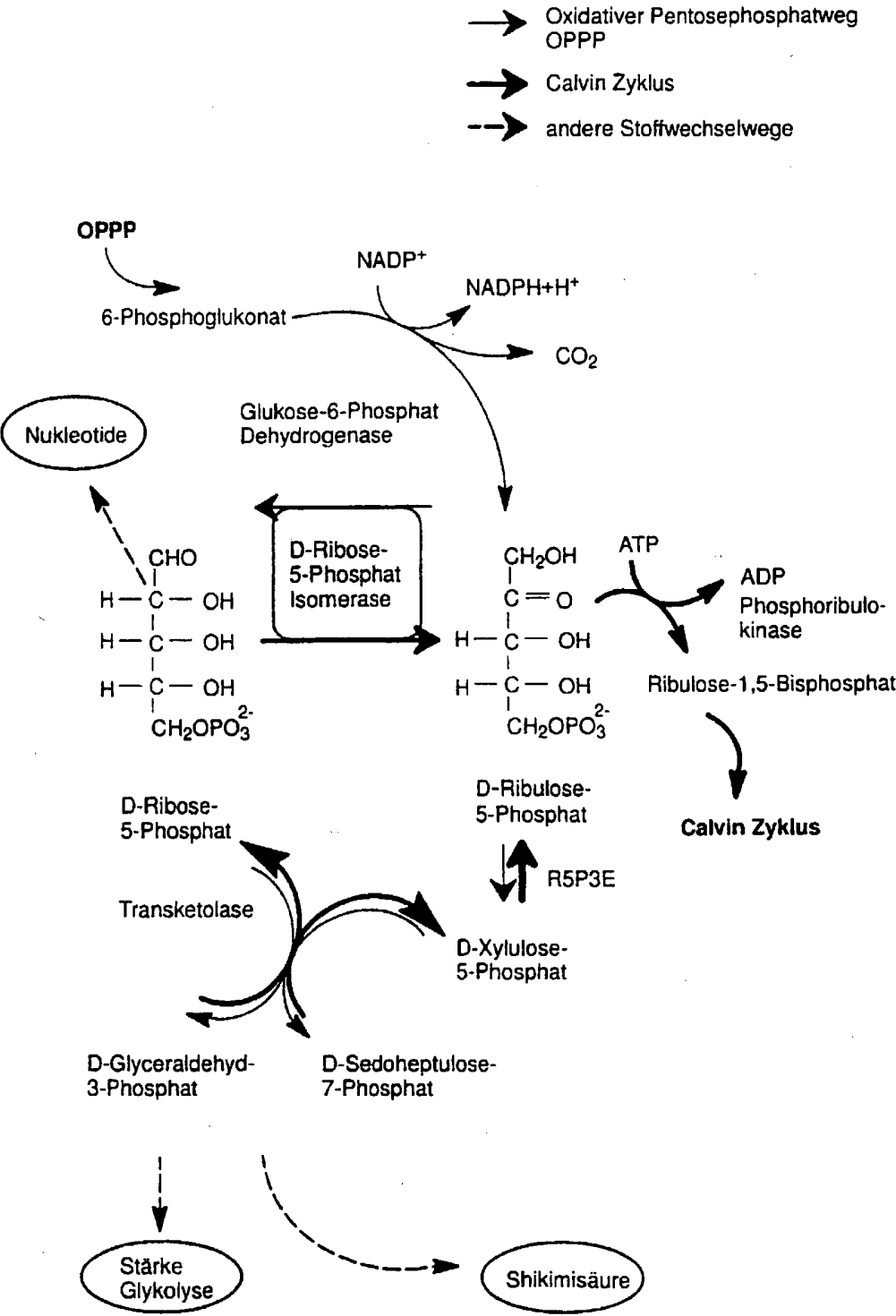


Abbildung 2.

CCGCTCTCAA	ACTCAAACCTC	TCCAATGGCT	TCCGCCGCTT	TCTCTCTCCT	50
CCCCTCCACC	TCCTCCACCA	CCTTTAACCG	CCATGCCACC	ACCAAACCTCC	100
TCAACCTCAA	ATTCCTCCAC	AACCACCGTA	ACAAACCCTT	CTTCACCACC	150
ACAATCAAAT	CTCTCTCTTC	TCCCTCCCCA	ACACCAGTCT	TAACTCAAGA	200
CGATCTCAAG	AAACTCGCCG	CCGAAAAAGC	CGTCGACTCC	GTCAAATCCG	250
GCATGGTTCT	CGGTCTCGGA	ACCGGAAGTA	CTGCCGCATT	TGCTGTCTCG	300
CGAATCGGCG	AGCTTCTCTC	TGCCGGAAAA	CTGACCAACA	TCGTTGGAAT	350
TCCTACCTCG	AAGCGGACCG	CAGAGCAGGC	GGCGTCTCTT	GGAATTCCGC	400
TCTCCGTTCT	CGATGATCAT	CCTCGAATTG	ACCTCGCCAT	TGATGGCGCC	450
GATGAGGTTG	ATCCTGATCT	TAATCTGGTT	AAGGGGCGCG	GTGGGGCGCT	500
CTTGAGAGAA	AAGATGGTTG	AAGCTGCTAG	TGATAAATTT	ATTGTTGTTG	550
TTGATGATAC	TAAGCTTGTT	GATGGTTTGG	GTGGTAGTCG	TCTTGCTATG	600
CCTGTTGAAG	TTGTTCAATT	TTGCTGGAAA	TATAATCTCA	AGAGATTACA	650
GGAGATCTTT	AAGGAGCTGG	GTTGTGAGGC	AAAATTGAGA	ATGGAAGGGG	700
ATAGCAGTCC	TTATGTGACT	GACAACTCGA	ATTACATCGT	GGATTTATAC	750
TTCCCGACCT	CGATTAAGGA	TGCTGAAGCT	GCAGGGAGAG	AAATTTCCGC	800
CTTGGAAGGC	GATAGTAGAAC	ATGGGTGTTT	CTTGGGTATG	GCTAGCGAAG	850
TCATCATTGC	TGGGAAAACCT	GGAGTTAGTG	TGAAAACCAA	GTGATTTTTG	900
TTGGTTTGAT	TGGTTGACTT	CCGGGTATGG	AATAGTCTCC	CTCTCCCCAG	950
AATACCTACT	TGTTTTTCATT	TTATATATGT	TCTCTCTCAC	TTCATGTAAT	1000
CTTTAGATGA	GTTTCTGGGG	TCTGGTTTGA	TATTTTTGCA	TCTGTTGTAT	1050
CTGTTTATTG	TTTTGATTTT	AGCTAATTGT	GTTATGAAGT	GTAGATGAGG	1100
AATCAATGGC	GAGAGCGG				1118

Abbildung 3.

```

MET ALA SER ALA ALA PHE SER LEU LEU PRO SER THR SER SER THR 15
THR PHE ASN ARG HIS ALA THR THR LYS LEU LEU ASN LEU LYS PHE 30
LEU HIS ASN HIS ARG ASN LYS PRO PHE PHE THR THR THR ILE LYS 45
SER LEU SER SER PRO SER PRO THR PRO VAL LEU THR GLN ASP ASP 60
LEU LYS LYS LEU ALA ALA GLU LYS ALA VAL ASP SER VAL LYS SER 75
GLY MET VAL LEU GLY LEU GLY THR GLY SER THR ALA ALA PHE ALA 90
VAL SER ARG ILE GLY GLU LEU LEU SER ALA GLY LYS LEU THR ASN 105
ILE VAL GLY ILE PRO THR SER LYS ARG THR ALA GLU GLN ALA ALA 120
SER LEU GLY ILE PRO LEU SER VAL LEU ASP ASP HIS PRO ARG ILE 135
ASP LEU ALA ILE ASP GLY ALA ASP GLU VAL ASP PRO ASP LEU ASN 150
LEU VAL LYS GLY ARG GLY GLY ALA LEU LEU ARG GLU LYS MET VAL 165
GLU ALA ALA SER ASP PHE LYS ILE VAL VAL VAL ASP ASP THR LYS 180
LEU VAL ASP GLY LEU GLY GLY SER ARG LEU ALA MET PRO VAL GLU 195
VAL VAL GLN PHE CYS LYS TRP TYR ASN LEU LYS ARG LEU GLN GLU 210
ILE PHE LYS GLU LEU GLY CYS GLU ALA LYS LEU ARG MET GLU GLY 225
ASP SER SER PRO TYR VAL THR ASP ASN SER ASN TYR ILE VAL ASP 240
LEU TYR PHE PRO THR SER ILE LYS ASP ALA GLU ALA ALA GLY ARG 255
GLU ILE SER ALA LEU GLU GLY VAL VAL GLU HIS GLY LEU PHE LEU 270
GLY MET ALA SER GLU VAL ILE ILE ALA GLY LYS THR GLY VAL SER 285
VAL LYS THR LYS STOP

```

ABBILDUNG 4.

SPINAT	SPTPVLTQDDLKKLAAEKAVD·SVKSGMVLGLGTGSTAAFAVSR
SYNECHOCYSTIS	MAELDAANLMKQAVGKAAADRVKSNITIVGLGTGSTTAYALEF
E. COLI RPIA	MTQDELKKAVGWAALQ·YVQPGTIVGVGTGSTAAHFIDA
HAEMOPHILUS	MNQLEMKKLAAQAALQ·YVKADTIVGVGSGSTVNCFIEA
CAENORHABDITIS	MVTSTGPEAELAPIEQAKKRAAFACGEKYVQSGCRLGVGSGSTVKYLVEY
MAUS	MSKAEAEAKKLASHTAVENHVKNNOVLGIGSGSTIVHAVQR

* * * * *

SPINAT	IGELLSAGKLTNIVGIPTSKRTAEQAASLGIPLSVLDDHPRIDLAI DGAD
SYNECHOCYSTIS	IGDRLKKGELENVVGIPTSFQAEVLARKYGIPLTTL DVADRIDIAIDGAD
E. COLI RPIA	LGTMKGQIE·····GAVSSSDASTEKLKSLGIHVFDLNEVD SLGIYVDGAD
HAEMOPHILUS	LGTIKDKIQ·····GAVAASKESEELLRKQGI EVFNANDVSSLDIYVDGAD
CAENORHABDITIS	LKQGFQNGSLKDIICVPTSFLTQWLIESGLPVSDLD SHPELDVICIDGAD
MOUSE	IAERVKQENL·DLICIPTS FQARQLILQYGLT LSDL DQHP EIDLAI DGAD

SPINAT	EVD PDLNLVKG RGGALLREKMVEAASDKFIVVDDTKLVDGLGGS R·LAM
SYNECHOCYSTIS	EVD P QKNLIKGGGAHTREKIVDALAETFLVVVD SGKLVDKLGSTF·LL
HAEMOPHILUS	EINPQKMMIKGGGAALTREKIVAALAKKFICIVDSSKQVDVLGSTF·PL
E. COLI RPIA	EINGHMQMIKGGGAALTREKIIASVAEKFICIA DASKQVDILGKF·PL
CAENORHABDITIS	EVDGQFTCIKGGGCLAQEKIVQTA AKNFYVIADYLKDSKHLGDRY·PNV
MAUS	EVD AELNLIKGGGCLTQEKIVAGYASRFIV IADFRKDSKNLGD RWHKGI

* * * * *

SPINAT	PVEVVQFCWKYNLKR LQEIFKELGCEAKLRMEGDS·SPYVTDNSNYIVDL
SYNECHOCYSTIS	PVEVIPMALTPVMRAL·····AKLGKPELRMGVKKAGPVVTDQGNLVIDV
HAEMOPHILUS	PVEVIPMARSQVGRKL·····AALGGSPEYREGV·····VTDNGNVILDV
E. COLI RPIA	PVEVIPMARS A VARQL·····VKLGG RPEYRQGV·····VTDNGNVILDV
CAENORHABDITIS	PIEVLPLAAQPLRSIP···RAEGGSCQLRQAVKKCGPIVTDNGNFIIDW
MAUS	PIEVIPMAYVPVSR A V···QKFGGEVELRMAVNKAGPVVTDNGNFILDW

* * * * *

SPINAT	YFPTSIKD AEA·AGREISALEGVVEHGLFLGMASEVIIAGKTGVS VKTK
SYNECHOCYSTIS	KFDAITNPAEL···EKTINNLPGLVLENGLFVGV·ADVILVGEIIDGQPTV
HAEMOPHILUS	HNFSILNPVEI···EKELNNVAGVV TNGIFALRGADVIVGTPEGAKVID
E. COLI RPIA	HGMEILDPIAM···ENAINAIPGVVTVGLFANRGADVALIGTPDGVK TIV
CAENORHABDITIS	QFEKNVSGRDWFAIQORLANTPGIVETGLFIG·CVD AVFFAYS DGSVKEI
MAUS	KFDRVHKWSEV···NTAIKMTPGVVD TGLFIN·MAERVYFGMQDGSVNVR

* * *

SPINAT	
SYNECHOCYSTIS	REF
HAEMOPHILUS	
E. COLI RPIA	K
CAENORHABDITIS	VNSKK
MAUS	EKPF

ABBILDUNG 5.

Peptidsequenzen und abgeleitete degenerierte Oligonukleotidsequenzen der plastidären Ribose-5-Phosphat Isomerase aus Spinat

a) Spaltung über Cyanbromid

1. SPTPVLQTDDLKKLAAEKAVDSVK
2. (M) VEAASDKFIVVDDTKLVDGLGGS
3. (M) ASEVIIAGKTGVSVKT

b) Spaltung durch Endopeptidase LysC

4. SPTPVLQTDDLK
5. (K) MVEAASDK
6. (K) FIVVDDTK
7. (K) LVDGLGGSRLAMPVEVVQFCWK
8. (K) RTAEQAASLGIPLSVLDDHPRIDLAIDGADEVDPDLN
9. (K) NIVGIPTSK
10. (K) YNLK
11. (K) XRLQEIFK

aus den Peptidsequenzen Nr. 2 und Nr. 7 abgeleitete Oligonukleotidsequenzen

Peptidsequenz	Oligonukleotid
2. KMVEAA	aaatgggtngargcngc
7. VQFCWK	ttccarcaraaytgnac